УДК 578-083

ОБ УПРОЩЕННОМ СПОСОБЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ ТРИХОМОНАД

И. К. Падченко

(Киевский институт эпидемиологии, микробиологии и паразитологии)

Без предварительного получения в лабораторных условиях чистой культуры возбудителя заболевания очень трудно изучить его жизненный цикл, метаболизм и биохимические свойства, а также патогенез, химиотерапию и возникновение иммунитета при вызываемой им болезни.

Безбактериальные культуры урогенитальных трихомонад впервые были получены на питательных средах Джонсоном (Johnson, 1940) и Трасселлом с соавторами (Trussell et al., 1940). С тех пор выделение чистых штаммов этих простейших фактически не вызывает никаких затруднений, хотя большинство питательных сред весьма сложны по своему составу и технологии приготовления. Между тем проблема длительного сохранения трихомонад вне организма человека или животного без частых пересевов на питательных средах (в среднем через каждые 3—4 дня) в условиях большинства лабораторий остается до сих пор практически нерешенной.

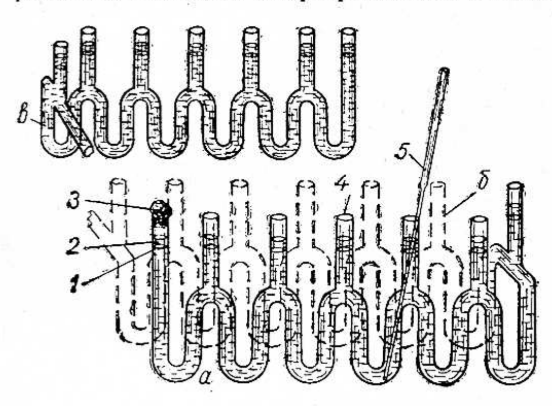
Необходимо подчеркнуть, что потребность длительного сохранения различных видов микроорганизмов, в том числе и патогенных простейших (лейшмании, плазмодии, амебы, трихомонады и др.), возникла еще в прошлом веке. Однако осуществление этой задачи всегда наталкивалось на трудности, связанные с чрезвычайной нестойкостью биологических материалов. Например, в случае хранения патогенных простейших на питательных средах происходит обычно быстрое их отмирание. Так, на среде TV (Терас, 1955) они выживают без пересева, согласно нашим данным (1960), не более 9 суток. Не более 25—50 дней трихомонады остаются жизнеспособными даже на тех из них (среда Павловой, «ПЛ» и др.), которые обеспечивают максимально длительную выживаемость простейших (Павлова, 1938; Парокинян, 1954; Севастьянова, 1961, и др.). Нельзя не учитывать и то обстоятельство, что численность трихомонад на среде Павловой оказывается весьма незначительной — не более 1—2 особей в нескольких полях зрения микроскопа (Севастьянова, 1961). Кроме того, необходимы частые пересевы, связанные обычно с большими затратами времени и нередко очень дефицитных материалов (солянокислого цистеина, совершенно свежей говяжьей печени и др.) для приготовления питательных сред, сроки пригодности которых, как правило, ограничены. Не более одного-двух месяцев остается пригодной, согласно нашим наблюдениям, например, среда TV. Изготовление же небольших количеств питательной среды неэкономично.

Не выдержали испытания и биологические способы сохранения трихомонад во влагалище или конъюнктиве экспериментально инфицированных подопытных животных (Prasad, Narayan, 1962) и культивирования их в курином эмбрионе (Fabio, 1961).

Более обнадеживающие результаты были получены при решении проблемы длительного хранения штаммов простейших теми авторами (Allain, 1964; Miller, 1966; Walker, 1966; Mieth, 1966 и др.), которые применили для этих целей метод замораживания, основанный на замедлении обменных процессов в клетках микроорганизмов. Наступающее при замораживании обезвоживание живой клетки благоприятствует ее анабиозу. Использование некоторыми авторами (Mc Entegart, 1954, 1959; Christian et al., 1963; Lindgren, Ivey, 1964; Miller, 1966) указанного способа позволило в ряде случаев сохранить трихомонады жизнеспособными при низких температурах (—43°; —79° С) в течение 60—420, а иногда даже 780 суток. Таким образом, надо согласиться с мнением тех исследователей (Diamond Louis, 1964; Walker, 1966), которые считают, что применение метода замораживания явилось значительным вкладом в разработку способов длительного сохранения различных видов паразитов.

Подобные данные о сроках выживания лейшманий (8—9 месяцев) получил В. Серебряков с соавторами (1967) при использовании метода лиофильного высушивания. По сравнению с замораживанием лиофильный метод, сущность которого состоит в высушивании под вакуумом организмов, находящихся в замороженном состоянии, является более прогрессивным, так как в этом случае резко уменьшается повреждающее воздействие обезвоживания и увеличивается возможность длительного хранения культур (Бланков, Клебанов, 1961).

Следует, однако, отметить, что замораживание и лиофильный метод, требующие для своего завершения не менее 9—16 часов, не всегда и не во всех лабораториях могут быть применены из-за сложной технологии. Присущи им и другие недостатки. В частности, установлено, что даже малейшее колебание температуры в процессе замораживания либо хранения простейших (или других микроорганизмов) оказывает на них губительное влияние и тем самым способствует сокращению сроков их выживаемости (Печникова, 1967; Fitzgerald et al., 1961; Kramer, 1962; Walker, 1966; Miller, 1966; и др.). Имеются, например, сведения, что после полугодового хранения в замороженном состоянии микроорганизмов, постоянным местом пребывания которых является организм человека или животного, жизнеспособными из них остается не более 1—1,5% (Fry, Greaves, 1951). При 128-дневном содержании трихомонад крупного рогатого скота при температуре —28° живыми оказалось 11%, при —95° — 37% замороженных особей (Levine, Andersen, 1966). В замороженной культуре ткани в течение одного года выживало не более 1% урогенитальных трихомонад (Christian et al., 1963).



Схематическое изображение первой (*а*), второй (*б*) и последней (*в*) секции устройства для длительного культивирования трихомонад.
Объяснение в тексте.

Успех глубокого замораживания в значительной мере зависит от постоянства температуры в процессе замораживания (Miller, 1966). Повышенному отмиранию микроорганизмов при замораживании способствуют также соли, в том числе хлористый натрий (Бланков, Клебанов, 1961), являющийся, как известно, обязательным компонентом питательных сред для трихомонад.

Имеются сообщения (Равич-Биргер, 1960; Печникова, 1965, 1967; Straka, Stokes, 1959, и др.), что у подвергавшихся замораживанию микроорганизмов оказываются нарушенными некоторые свойства и функции. Так, часть из них теряет способность синтезировать основные клеточные элементы, вследствие чего появляются отклонения в азотистом обмене, ферментативной, антигенной и иммуногенной активности паразитов.

Обобщение приведенных данных показало, что вопрос о длительном хранении патогенных простейших, в том числе и трихомонад, остается до сих пор по существу нерешенным.

Чтобы решить проблему длительного культивирования трихомонад без пересева, а следовательно, и длительного их хранения, мы решили воспользоваться присущей им подвижностью в условиях, создаваемых прибором соответствующей конструкции, при оптимальном для трихомонад температурном режиме.

При конструировании прибора мы учли то обстоятельство, что трихомонады в процессе размножения in vitro обычно постепенно распространяются с нижнего к верхнему полюсу пробирки, что подтверждалось результатами многолетних наблюдений. В процессе поиска наилучшей модели прибора устранялись недостатки, имевшиеся в предыдущих конструкциях. Окончательный вариант созданного нами устройства зарегистрирован Комитетом по делам изобретений и открытий как изобретение за № 1141360/31—16, авторское свидетельство № 211745.

На рисунке изображен общий вид первой (*а*), второй (*б*) и последней (*в*) секций устройства для длительного культивирования трихомонад.

Устройство состоит из системы восьми (или более) сообщающихся параллельных секций волнообразно изогнутых стеклянных трубок. Каждый изгиб снабжен сверху отводящей трубкой (*4*), предназначенной для удаления из устройства газа, образующегося при росте трихомонад. Отводящие трубки (*4*) расположены таким образом, что через каждую из них доступны для Пастеровской пипетки (*5*) оба смежно расположенных нижних изгиба устройства. Расположение второй секции на рисунке изображено пунктирной линией.

Для культивирования трихомонад стерильный прибор заполняют свежей питательной средой так, чтобы ее уровень (*1*) находился не менее чем на 3 *см* ниже ватно-марлевых пробок (*3*), которыми закрывают отводящие трубки. Поверхность питательной среды в каждой отводящей трубке заливают слоем в 0,5—0,6 *см* или несколько более стерильного вазелинового масла (*2*), чтобы не допустить испарения питательной среды. Посев культуры урогенитальных трихомонад производят Пастеровской пипеткой в крайнюю трубку (пробирку) первой секции устройства. Контроль за ростом простейших осуществляют визуально (по помутнению питательной среды) или микроскопи-

чески. Культивирование трихомонад, а следовательно, и длительное их сохранение производится в термостате при температуре 36—37°, т. е. примерно в условиях, соответствующих естественной среде обитания этих простейших.

В случае использования восьмисекционного устройства, заполненного питательной средой TV-1 (Терас, 1961), рост культуры трихомонад продолжался в течение 125 дней, т. е. свыше четырех месяцев. Культивирование трихомонад более чем в восьми секциях мы не производили, однако, не сомневаемся, что полученные нами сроки сохранения жизнеспособности простейших не являются предельными. Об этом свидетельствует и тот факт, что интенсивность роста культуры трихомонад в последней пробирке (трубке) устройства оставалась прежней.

Следует отметить, что условия в приборе обеспечили длительное (свыше четырех месяцев) сохранение трихомонад без изменений их морфологических особенностей и физиологических свойств, чем они весьма выгодно отличаются от простейших, подвергавшихся, например замораживанию. Характерной особенностью предлагаемого метода длительного сохранения трихомонад без пересева и без риска потерять штамм простейших от нарушений температурного режима является также то, что в устройстве всегда содержатся трихомонады желаемой плотности и возраста.

Имеются все основания считать, что предлагаемый прибор может быть использован также для культивирования и длительного хранения других видов простейших и бактерий, обладающих подвижностью и размножающихся на жидких или полужидких питательных средах.

ВЫВОДЫ

1. С помощью устройства для длительного культивирования трихомонад предлагается упрощенный способ культивирования и длительного хранения этих простейших.
2. Прибор практически применим в каждой лаборатории, а вызываемые при этом методе затраты сил и средств, связанные с хранением простейших, оказываются самыми минимальными в современной практике хранения микроорганизмов.
3. Культивируемые в устройстве трихомонады не изменяют ни морфологических особенностей, ни физиологических свойств.
4. В устройстве всегда имеются трихомонады желаемой плотности и возраста.

ЛИТЕРАТУРА

Бланков Б. И., Клебанов Д. Л. 1961. Применение лиофилизации в микробиологии. М.

Павлова Е. А. 1938. К методике культивирования *Ent. histolytica.* Мед. паразитол. и паразитарн. бол., т. 7, в. 2.

Парокинян Г. М. 1954. Экспериментальное обоснование химиотерапии трихомонадной инфекции (*Trichomonas vaginalis*). Автореф. канд. дисс. Ереван.

Печникова И. В. 1967. Влияние состава среды высушивания на термоустойчивость чумной живой сухой вакцины ЕВ в процессе длительного хранения. Автореф. канд. дисс. Саратов.

Равич-Биргер Е. 1960. О восстановлении культур микробов из высушенного состояния. ЖМЭИ, № 3.

Севасьянова Н. И. 1961. Материалы по культивированию трихомонас вагиналис Донне на некоторых питательных средах. Тр. Одесск. н.-и. ин-та эпидемиол. и микробиол.

Серебряков В. А., Юсупов К. А., Ни Г. В., Шишляева-Матова З. С. 1967. Опыты по лиофильному высушиванию культуры *Leishmania tropica major.* Мед. паразитол. и паразитар. бол., № 3.

Терас Ю. Х. 1955. О выращивании *Trochomonas vaginalis* в чистых культурах. ЖМЭИ, № 8.

Его же. 1961. О защитном действии сыворотки крови больных трихомониазом урогенитального тракта на белых мышей, внутрибрюшинно инфицированных культурами *Trichomonas vaginalis.* Изв. АН ЭССР, сер. биол., № 1.

Allain D. 1964. Evaluation of the viability and pathogenicity of hemoflagellates after freezing and storage. J. Parasitol., v. 50, № 5.

Diamond Louis S. 1964. Recent advances in the cultivation and cryogenic preservation of *Entamoeba histolytica.* Amer. J. Gastroenterol., v. 41, 4.

Christian R., Miller N., Ludovici P., Riley G. 1963. A study of: *Trichomonas vaginalis* in human cele culture. Amer. J. Obstetr. a. Gynecol., v. 85, № 7.

Fabio U. 1961. Sulla coltivazione di *Trichomonas vaginalis* in nova di pollo embrionate. Giorn. bacteriol. virol. ed immunol., t. 54, № 9—10.

Fitzgerald P., Levine N. 1961. Effect of storage temperature, equilibration time, and buffers on survival of *Trichomonas foetus* in the prosence of glycerol at freezing temperatures.J. Protozool., v. 8, № 1.

Fry R., Greaves R. 1951. The survival of bacteria during and after Drying. J. Hyg., v. 49.
Johnson G. 1940. Physiology of pure culture *Trichomonas vaginalis;* population in relation to pH. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med, № 45.
Johnson G., Trassell R. 1943. *Tr. vaginalis.* Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., № 54.
Kramer K. 1962. Die Konservierung der Virulenz und Pathogenität von Trypanosomen durch Aufbewahrung bei tiefen Temperaturen. Z. ges. Hyg., Bd. 55, № 12.
Levine Norman D., Andersen Ferron L. 1966. Frozen storage of *Tritrichomonas foetus* for 5,6 years. J. Protozool., v. 13, № 2.
Lindgren R., Ivey M. 1964. The effect of cultivation and freezing on the virulence of *Trichomonas vaginalis* for mice. J. Parasitol., v. 50, № 2.
Mieth H. 1966. Tiefgefrierkonservierung verschiedener Blut- und Gewebeprotozoen in flussügem Stiekstoff. Z. Tropenmed. u. Parasitol., v. 17, № 1.
Miller W. 1966. Zur Frage der Konservierung von Laborstämmen verschiedener Trichomonas- und Tritrichomonasarten durch tiefe Temperaturen. Z. Tropenmed. u. Parasitol., Bd. 17, № 1.
Mc Entegart M. 1954. The maintenance of stock strains of trichomonads by freezing. J. Hyg., v. 52, № 4.
Его же. 1959. Prolonged survival of *Trichomonas vaginalis* at—79° C. Nature, v. 183, № 4656.
Prasad H., Narayan K. 1962. Cultivation of *Trichomonas foetus* in vivo. Indian Veterin. J., v. 39, № 9.
Straka R., Stokes G. 1959. Metabolic ingury to bacteria at low temperatures. J. Bact., v. 78, № 2.
Trussell R. E., Plass E. D. 1940. The pathogenicity and Physiology of a pure culture of *Trichomonas vaginalis.* Amer. J. Obstetr. a. Gynecol., v. 40, № 5.
Walker P. 1966. Freeze preservation of parasitic protozoa. Lab. Pract., v. 15, № 4.

Поступила 29.VIII 1967 г.

ON A SIMPLIFIED METHOD OF CULTIVATION AND PROLONGED PRESERVATION OF TRICHOMONADES

I. K. Padchenko

(Kiev Institute of Epidemiology, Microbiology and Parasitology)

Summary

A problem of prolonged preservation of pathogenic Protozoa is almost unsettled until now. The existing methods of culture preservation (freezing, lyophilization etc.) do not satisfy the requirements of the biological and medical science and practice because of their complexity. The proposed method permits the problem of simplified cultuvation and prolonged (more than 4 months) preservation of trichomonades without reinoculation to be solved in a quite different way. The trichomonades do not change their morphological peculiarities and physiological properties.

Utilazation of Protozoa mobility under the conditions created by a device of the corresponding design at a temperature range optimal for trichomonades is a basis of the method. The Protozoa of the desired density and age are always contained in the device. This effective method of trichomonade cultivation is very simple and easy for any laboratory.